

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>A61K 39/12, C12N 7/04</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/24420</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 4. Mai 2000 (04.05.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/07588 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Oktober 1999 (09.10.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 49 641.9      28. Oktober 1998 (28.10.98)      DE <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SONNTAG, Hans-Günter [DE/DE]; Mozartstrasse 8, D-69245 Bammental (DE). NOLTE, Oliver [DE/DE]; Tinguieux-Allee 15, D-69181 Leimen (DE). WEISS, Hannelore [DE/DE]; Dreikreuzweg 4, D-69151 Neckargemünd (DE). WEISS, Hans-Erich [DE/DE]; Dreikreuzweg 4, D-69151 Neckargemünd (DE). <b>(74) Anwalt:</b> ZELLENTIN, Wiger; Zellentin & Partner, Rubensstrasse 30, D-67061 Ludwigshafen (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR THE PRODUCTION OF AN ANTIVIRAL AGENT <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES ANTIVIRALEN MITTELS <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to a method for the production of an antiviral agent, wherein blood containing virus and antigens is heated at a temperature approximately higher than 50° C in the presence of protein crosslinking agents, preferably formaldehyde, p-formaldehyde and/or phenol or phenol derivatives.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines antiviralen Mittels, bei welchem man erfindungsgemäß Viren und Antigene enthaltendes Blut in Gegenwart von Proteine quervernetzenden Mitteln wie vorzugsweise Formaldehyd, p-Formaldehyd und/oder Phenol oder Phenolderivaten auf Temperaturen von über etwa 50 °C erwärmt.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Verfahren zur Herstellung eines antiviralen Mittels

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neuartiges Verfahren zur Herstellung eines antiviralen Mittels.

Es ist bekannt, daß Viren nicht oder nur ungenügend im menschlichen oder dem Tierkörper bekämpft werden können. So ist es bis heute nicht gelungen, HIV-positive Patienten zu heilen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die Viren ihre Form individuell und über die Zeit zu ändern imstande sind, so daß vorhandene Wirkungsmechanismen ausgeschaltet werden.

Die vorliegende Erfindung hat sich demgegenüber die Aufgabe gestellt, ein antivirales Mittel zur Verfügung zu stellen, das spezifisch zu wirken und damit die Heilungschancen wesentlich zu verbessern in der Lage ist.

Die Lösung gelingt mit einem Verfahren gemäß Hauptanspruch. Vorteilhafte Ausgestaltungen dieses Verfahrens finden sich in den Unteransprüchen.

Das erfindungsgemäße Mittel stellt eine Autovakzine dar, die z. B. bei entsprechender Aufarbeitung subkutan oder peroral über die Schleimhaut verabreicht werden kann.

Durch die Behandlung patienteneigenen Blutes bei erhöhten Temperaturen in Gegenwart quervernetzender Reagenzien wie z. B. (p)Formaldehyd oder Phenol werden alle im Blut enthaltenen Proteine individuell quervernetzt und dadurch denaturiert, d. h. es wird auf das Virus bzw. das im Blut enthaltene Antigen in einer spezifischen Weise eingewirkt, was überraschenderweise nach gegebenenfalls mehrfacher Applikation zu einer Virensuppression führt.

Das entnommene Blut wird während der Abnahme und danach durch mechanische Einwirkung bzw. durch chemische Gerinnungshemmer wie z. B. EDTA, Heparin und Hirudin flüssig gehalten, um eine gute Verteilung des Vernetzungsmittels zu gewährleisten.

Durch die Denaturierungsbehandlung verfestigt sich das Blut und es formen sich die eine anti-Erreger-spezifische Immunantwort induzierenden Partikel. Das verfestigte Blut wird zur Anwendung verflüssigt, wobei man z. B. unter Rühren pyrogenfreie physiologische Kochsalzlösung einträgt.

Zur Herstellung einer (subkutan zu verabreichenden) Vakzine wird das Blut über Filter mit Porengrößen von etwa 400 µm filtriert. Das verflüssigte Mittel kann dem Patienten auch über die Schleimhäute des Mund/Rachenraumes (Gurgeln) verabreicht werden.

Das mechanische Aufrechterhalten der Fließfähigkeit des Blutes bei der Abnahme und danach, d. h. die Zerstörung von Fibrin, kann in an sich bekannter Weise durch Schütteln in Gegenwart von Glasperlen vorgenommen werden.

Soweit die zu bekämpfenden Viren vorzugsweise an die Lymphocyten gebunden sind, d.h. in den begleitenden Erythrocyten und im Serum nur in geringer Menge vorkommen, läßt sich eine Anreicherung dadurch erreichen, daß die Erythrocyten in bekannter Weise zunächst lysiert werden und Serum und lysierte Erythrocyten anschließend durch Zentrifugieren von den Lymphocyten getrennt werden. Durch Resuspendieren der Lymphocytenfraktion in physiologischer Kochsalzlösung oder in PBS (phosphate buffered saline) kann dann eine geeignete Konzentration hergestellt werden, die dann wie das Vollblut mit quervernetzenden Mitteln behandelt wird, um die erfindungsgemäße Vakzine herzustellen. Bei Viren, die in hoher Konzentration im Blutserum vorkommen (z.B. Hepatitis B- und C-Viren, deren Ursprung die Leber ist sowie andere vergleichbare Viren, die im Blut vorkommen aber ihren Ursprung nicht in den Blutzellen haben), ist das Verfahren zur Lyse der Erythrocyten nicht sinnvoll, da die Viren nach Abzentrifugation der Lymphocyten in dem die lysierten Erythrocyten enthaltenden, zu verwerfenden Überstand verbleiben.

Eine weitere Abwandlung des Protokolls stellt die Trennung der Lymphocytenfraktion von den im Blut vorkommenden Viren über 10 minütige Zentrifugation der Lymphocyten nach erfolgter Erythrocyten-Lyse dar.

Nachfolgend werden sowohl die Viren als auch die Lymphocyten in Kultur genommen. Nach erfolgreicher Virusanzucht werden die präparierten Viren zur Infektion der kultivierten Lymphocyten eingesetzt um nach einigen Tagen nach dem Herstellungsrezept der Autovakzine behandelt zu werden.

Die Viren können über routinemäßig anwendbare Präparationstechniken gereinigt werden, die Kultur der Lymphocyten setzt, ebenfalls etablierte, Methoden zur Zellkultur voraus. Die Kulturmedien sollten serumfreie Supplemente haben oder vom Patienten gewonnenes, inaktiviertes Serum als Proteinquelle enthalten. In jedem Fall ist hier besonderer Wert auf eine Sensibilitätstestung zu legen, da der Anteil körperfremder Substanzen relativ hoch liegt.

Die Methode ist z.B. für Hepatitis B Viren applikabel. Ziel dieser Behandlung bleibt es, die Autovakzine den in vivo-Verhältnissen möglichst weit anzugleichen, soll heißen, nicht nur die Viren als auslösende Erreger einer chronischen/ persistierenden/rezidivierenden Infektion werden denaturiert sondern auch die Immunzellen, die mit diesen Viren in Kontakt kommen sowie die auf diesen Immunzellen exprimierten Oberflächenrezeptoren zur Antigenpräsentation. Über die Abtrennung der Lymphocyten wird wie oben eine etwas "appetitlichere" Erscheinung der Autovakzine erreicht.

Eine zusätzliche Abwandlung des Protokolls stellt die Ultraschallbehandlung der, wie oben beschrieben, gewonnenen Lymphocyten dar. Hierzu wird mit einer etablierten Ultraschallbehandlung eine Zerstörung der Zellen und damit eine Fraktionierung der Virusproteine als auch der mit Virusprotein assoziierten Oberflächenrezeptoren ermöglicht. Diese Fraktionen unterliegen in der nachfolgenden Formalin- (oder durch andere Quervernetzer erreichten) Denaturierung ebenfalls einer Quervernetzung.

Für die Quervernetzung der Proteine hat sich Formalin als besonders geeignet herausgestellt, dieses wird dem Blut in einer Menge von mindestens etwa 0,1 bis etwa 1,0 Volumenprozent in Form einer gesättigten Formalinlösung zugegeben.

Die Denaturierungstemperatur liegt bei über 50° C, vorzugsweise bei zwischen 80 und 85° C, wobei man diese Temperatur etwa 2 Stunden aufrechterhält.

Der Wirkung des erfindungsgemäßen Mittels liegt folgendes zugrunde.

Der Begriff Autovakzine beschreibt eine therapeutische Maßnahme, bei der als wirksames Agens gegen eine bakterielle chronische Infektion Erreger vom Infektionsort entnommen, je nach Fall als Reinkultur gewonnen und anschließend physikalisch und/oder chemisch verändert werden.

Im konkreten Fall bedeutet das, daß für virale Erkrankungen, bei denen der Erreger im Blut oder zeitweise im Blut befindlich ist, dieses durch simultane Anwendung von Wärme und Formaldehyd behandelt wird. Diese Behandlung des Blutes und des Antigens (des Erregers) führt zu einer Veränderung der antigenen Eigenschaften durch Denaturierung der Proteine (Wärme) bei gleichzeitiger Quervernetzung (Formalin bzw. Formaldehyd oder Para-Formaldehyd oder Phenol bzw. seine Derivate). Diese Denaturierung plus Quervernetzung führt dazu, daß das Antigen (der Erreger) dem Immunsystem in einer anderen als der nativen Weise zugänglich wird. Daraus ergibt sich, daß auch Erreger, die im nativen Zustand möglicherweise unerkant bleiben oder eine nicht adäquate Form der Immunantwort induzieren (chronisch inflammatorischer Verlauf o. ä.), abgewehrt werden können. Hinzu kommt im Falle des Vollbluts, daß die lymphotropen Viren wie HIV auch in ihren unterschiedlichen Formen bei der Infektion der Zelle, bzw. bei der Freisetzung aus der Zelle oder in Interaktion mit bestimmten Bestandteilen/Rezeptoren der Zelle denaturiert, quervernetzt und für den Kontakt mit den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems aufbereitet und zur Verfügung gestellt werden.

Diese Überlegungen werden durch umfangreiche Untersuchungen sowohl mit tierischen als auch zum Teil mit menschlichen Patienten gestützt. Größtenteils handelte es sich dabei um chronisch persistierende oder rezidivierende Infektionen. Man kann also davon ausgehen, daß das Antigen dem Immunsystem grundsätzlich zugänglich war. Nach Applikation des Antigens in denaturierter und quervernetzter Form kam es in den meisten Fällen in weniger als vier Wochen zur

Heilung der Infektion. Dies kann nur durch die beschriebene veränderte Präsentationsform des Antigens durch Wärme und Formaldehyd erklärt werden.

Unsere experimentellen Daten deuten darauf hin, daß tatsächlich eine Veränderung in der Lage der Immunantwort nach Applikation der Autovakzine stattfindet. Diese Veränderung besteht, vereinfacht dargestellt, in einem Wechsel von einer inflammatorischen (Th1-) zu einer Helferzell-vermittelten (Th2-) Antwort. Aufgrund der Th2-Antwort gelingt es dem Immunsystem dann, den Erreger, der vorher zu einer chronisch inflammatorischen Situation geführt hat, zu eliminieren. Im Falle von HIV wird postuliert, daß es nach Applikation der erfindungsgemäßen Vakzine zu einer schützenden zytotoxischen T-Zell-Reaktion und gleichzeitig zu einer Veränderung in der Antikörperqualität kommt.

#### Ausführungsbeispiel

100 ml Blut werden in eine sterile 500ml-Flasche eingebracht, in der sich ca. 50 sterile Glasperlen (Durchmesser 3 - 5 mm) befinden und während der Abnahme und danach geschüttelt, um das Blut zu defibrinieren. Nach dem vollständigen Eintrag wurde 10 Minuten weitergeschüttelt, das Blut blieb flüssig.

Unter weiterem Schütteln wurden 0,5 ml einer gesättigten, chemisch reinen Formalinlösung zugegeben. Danach wurde die Flasche in ein Wasserbad gestellt und die Wassertemperatur langsam auf  $\geq 80^{\circ} \text{C} \leq 85^{\circ} \text{C}$  gebracht und 2 Stunden gehalten, dabei verfestigte sich die Masse.

Anschließend wurde auf das feste (schokoladisierte) Blut 200 ml sterile, pyrogenfreie physiologische NaCl-Lösung gegeben und die Flasche solange geschüttelt, bis die Glasperlen wieder frei waren und die Masse optisch homogen und flüssig. Danach wurde der Flascheninhalt auf ein steriles Sieb (Kantenlänge der Maschen ca. 400  $\mu\text{m}$ ) gegeben und mit einem sterilen Löffel durchpassiert.

Die Flasche enthält neben dem Blut 66 % phys. NaCl-Lösung sowie 0,5 ml einer gesättigten Formalin-Lösung.

Das Präparat wurde anschließend für 24 Stunden bei 37° C bebrütet.

Nach einer Sterilitätsuntersuchung wurde die Autovakzine gemäß nachstehendem Protokoll an einen Patienten abgegeben.

Für die Autovakzine-Behandlung wurde ein freiwilliger Patient ausgewählt, der nach Auskunft seines behandelnden Spezialisten eine "HIV-Infektion nach CDC Stadium C<sub>3</sub> mit Thrombocytopenie" aufwies, sowie weiterhin eine chronisch persistierende Hepatitis C und weitere Begleitkrankheiten, u. a. eine atypische Mycobacteriose. Aus ethischen und medizinischen Gründen war es nicht vertretbar, auf eine gleichzeitige Behandlung mit antiviralen Mitteln während der Autovakzine-Therapie zu verzichten.

Von dem Patienten lagen bezüglich der HI-Viruslast folgende Vorwerte unter Behandlung mit antiviralen Medikamenten vor:

Arztbrief:	3700 / µl
Bestimmung 3 Monate später (vor Beginn der Autovakzine-Therapie):	2500 / µl

Es wurde mit Vollblut des Patienten eine Autovakzine hergestellt, wie oben dargestellt. Die Applikation erfolgte einem spezifischen Schema folgend *subcutan* und *peroral*.

Dem Patienten wurde vor Beginn der Behandlung, 7 Tage, drei Wochen und acht Wochen nach der ersten Applikation der Autovakzine heparinisiertes Vollblut entnommen. Daraus wurden nach Standardverfahren über Ficoll die Lymphocyten gereinigt, Serum abgenommen und eingefroren und mit den Lymphocyten mittels spezifischer monoklonaler Antikörper die relativen Anteile der CD4-, CD8-, CD21- und CD3- (nicht zum ersten Termin) positiven Zellen im Durchflußcytometer bestimmt. Aus dem Serum wurde nach Abschluß des Versuchs der Neopterin-Wert bestimmt.



Bei der Präparation der Lymphocyten zeigte sich vom ersten zum vierten Termin eine deutliche Zunahme der Zellausbeute pro ml Vollblut (Anmerkung: diese kann natürlicherweise schwanken), wobei der Anteil kontaminierender Zellen wie Granulocyten und Thrombocyten, die bei dieser Präparation immer anfallen, deutlich zurückging. Im Verlauf der Behandlung zeigte sich eine deutliche Zunahme der CD4-, CD8- und CD3-positiven Zellen. Die CD8-positiven Zellen stiegen dabei nach unseren Messungen deutlich über den Normwert an. CD21-positive Zellen stiegen drei Wochen nach Beginn der Autovakzine-Behandlung an, fielen dann jedoch wieder ab, blieben dabei aber immer im Normbereich. Der Index CD4/CD8 lag bei der letzten Untersuchung bei 0,5 (Norm: 1.0 - 2.3), der Anteil der CD8-positiven Zellen lag jedoch weit über dem Normwert (49,9 % gemessen durch unabhängiges Labor, 17 - 35 % Normwert), was allgemein als Zeichen einer verstärkten zytotoxischen Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene, vorwiegend Viren, gewertet werden kann.

Der Neopterinwert (Parameter zur Verlaufskontrolle viraler sowie intrazellulärer Infektionen) im Serum war vor der Autovakzine erhöht, schwankte im Verlauf der Untersuchungen, lag nach Abschluß aber höher als zu Beginn (die Höhe des Neopterin-Spiegels wird allerdings auch durch Mycobacterien-Infektionen beeinflusst, bzw. allgemein durch inflammatorische Prozesse vom Th1-Typ, bei denen Interferon  $\gamma$  freigesetzt wird).

Daneben zeigte der Patient physiologische Reaktionen. Etwa 30 h nach der ersten Applikation der Vakzine reagierte er mit subfebrilen Temperaturen (aber keinerlei Entzündungszeichen an der Injektionsstelle) und leichtem Durchfall, was auf eine Immunreaktion schließen läßt. Im Verlauf der darauffolgenden Wochen zeigte der Patient nach Auskunft der behandelnden Ärztin eine bleibende Gewichtszunahme sowie eine deutliche Besserung des Allgemeinzustandes.

Bestimmung der HI-Viruslast nach Abschluß der Therapie  $< 50 / \mu\text{l}$  (entspricht Normbereich, dieser Wert wurde durch insgesamt vier voneinander unabhängigen Untersuchungen erhoben), jedoch positiv für HIV-Provirus-DNA (Genbereich gag). Dieser Befund deutet lediglich an, daß provirale DNA vorhanden ist, läßt aber keine Aussage über die tatsächliche Viruslast oder den Status einer floriden

Infektion zu (zur Messung der Viruslast wird die virale RNA gemessen, nach Zelltod freigesetzte DNA kann unter Umständen sehr lange nachweisbar sein).

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines antiviralen Mittels, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Viren und Antigene enthaltendes Blut in Gegenwart von Proteine quervernetzenden Mitteln wie vorzugsweise Formaldehyd, p-Formaldehyd und/oder Phenol oder Phenolderivaten auf Temperaturen von über etwa 50° C erwärmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Blut während der Abnahme vom Patienten und danach durch Agitieren oder allgemeine Gerinnungshemmer flüssig hält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das verfestigte Blut mit pyrogenfreier physiologischer Kochsalzlösung und mit Hilfe der in der Flasche befindlichen Glasperlen verflüssigt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Blut zur Herstellung einer Vakzine durch ein engporiges Filter passiert.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Agitation und die Verflüssigung durch die Kochsalzlösungszugabe durch Schütteln in Gegenwart von Glasperlen durchführt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Blut 0,3 bis 1,0, vorzugsweise 0,5 Volumenprozent einer gesättigten Formalinlösung zugegeben werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Blut in Gegenwart des quervernetzenden Mittels auf Temperaturen von etwa 55 bis 85° C erwärmt und diese Temperatur etwa 2 Stunden hält.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Blut zunächst einer Erythrocytenlyse unterworfen, die Lymphocytenfraktion abzentrifugiert, in physiologischer Kochsalzlösung oder PBS resuspendiert wird und danach mit den quervernetzenden Mitteln behandelt wird.
9. Denaturierte Antigene und Viren, erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Antivirales Mittel, enthaltend durch Denaturierung gemäß Anspruch 1 bis 8 hergestellte Antigene und/oder Viren.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 99/07588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K39/12 C12N7/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 698 432 A (OXFORD JOHN SIDNEY) 16 December 1997 (1997-12-16) column 1, line 11 - line 13 column 6, line 4 - line 12 column 6, line 48 - column 7, line 43 column 10, line 8 - line 49 claims 1-4,11	1-10
A	DD 206 842 A (OLESCH BERND; RAUSCHERT KUNZ; WARTIG PETER) 8 February 1984 (1984-02-08) the whole document	1-8
A	EP 0 479 280 A (YEDA RES & DEV) 8 April 1992 (1992-04-08) page 5, line 13 - line 22 page 6, line 37 - line 49 page 7, line 24 - line 33 claims 1,6,8,9	1-10

---  
-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2000

Date of mailing of the international search report

27/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07588

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 618 664 A (KIESSLING ANN A) 8 April 1997 (1997-04-08) column 6, line 3 - line 13 column 6, line 49 - line 65 column 8, line 18 - column 9, line 45 claims 1-4, 14-16, 26 ---	1-8
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198141 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1981-74702D XP002133362 & JP 56 108716 A (SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO), 28 August 1981 (1981-08-28) abstract ---	1-10
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198951 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1989-374115 XP002133363 & JP 01 279843 A (CHIBA-KEN), 10 November 1989 (1989-11-10) abstract -----	9, 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07588

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5698432 A	16-12-1997	AT 172642 T	15-11-1998
		AU 652447 B	25-08-1994
		AU 1634092 A	17-12-1992
		CA 2068817 A	18-11-1992
		DE 69227400 D	03-12-1998
		DE 69227400 T	01-07-1999
		EP 0514199 A	19-11-1992
		ES 2127203 T	16-04-1999
		JP 5328967 A	14-12-1993
		KR 149182 B	15-10-1998
		NZ 242780 A	26-07-1994
		SG 49763 A	15-06-1998
		ZA 9203607 A	24-02-1993
DD 206842 A	08-02-1984	NONE	
EP 0479280 A	08-04-1992	NONE	
US 5618664 A	08-04-1997	NONE	
JP 56108716 A	28-08-1981	JP 1424862 C	15-02-1988
		JP 62034725 B	28-07-1987
JP 1279843 A	10-11-1989	JP 2042887 C	09-04-1996
		JP 7061955 B	05-07-1995

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

IPK 7 A61K39/12 C12N7/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 698 432 A (OXFORD JOHN SIDNEY) 16. Dezember 1997 (1997-12-16) Spalte 1, Zeile 11 - Zeile 13 Spalte 6, Zeile 4 - Zeile 12 Spalte 6, Zeile 48 - Spalte 7, Zeile 43 Spalte 10, Zeile 8 - Zeile 49 Ansprüche 1-4, 11	1-10
A	DD 206 842 A (OLESCH BERND; RAUSCHERT KUNZ; WARTIG PETER) 8. Februar 1984 (1984-02-08) das ganze Dokument	1-8
A	EP 0 479 280 A (YEDA RES & DEV) 8. April 1992 (1992-04-08) Seite 5, Zeile 13 - Zeile 22 Seite 6, Zeile 37 - Zeile 49 Seite 7, Zeile 24 - Zeile 33 Ansprüche 1, 6, 8, 9	1-10
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeter Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeter Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. März 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/03/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 618 664 A (KIESSLING ANN A) 8. April 1997 (1997-04-08) Spalte 6, Zeile 3 - Zeile 13 Spalte 6, Zeile 49 - Zeile 65 Spalte 8, Zeile 18 - Spalte 9, Zeile 45 Ansprüche 1-4, 14-16, 26	1-8
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198141 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1981-74702D XP002133362 & JP 56 108716 A (SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO), 28. August 1981 (1981-08-28) Zusammenfassung	1-10
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198951 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1989-374115 XP002133363 & JP 01 279843 A (CHIBA-KEN), 10. November 1989 (1989-11-10) Zusammenfassung	9, 10

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07588

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5698432	A	16-12-1997	AT	172642 T	15-11-1998
			AU	652447 B	25-08-1994
			AU	1634092 A	17-12-1992
			CA	2068817 A	18-11-1992
			DE	69227400 D	03-12-1998
			DE	69227400 T	01-07-1999
			EP	0514199 A	19-11-1992
			ES	2127203 T	16-04-1999
			JP	5328967 A	14-12-1993
			KR	149182 B	15-10-1998
			NZ	242780 A	26-07-1994
			SG	49763 A	15-06-1998
			ZA	9203607 A	24-02-1993
			<hr/>		
DD 206842	A	08-02-1984	KEINE		
<hr/>					
EP 0479280	A	08-04-1992	KEINE		
<hr/>					
US 5618664	A	08-04-1997	KEINE		
<hr/>					
JP 56108716	A	28-08-1981	JP	1424862 C	15-02-1988
			JP	62034725 B	28-07-1987
<hr/>					
JP 1279843	A	10-11-1989	JP	2042887 C	09-04-1996
			JP	7061955 B	05-07-1995
<hr/>					